

## PRODUCTION OF THEANINE

### Abstract:

**PURPOSE:** To industrially and advantageously obtain the subject compound useful as a principal ingredient of flavor in GYOKURO (refined green tea) for flavorful substance, etc., of foods such as green tea by reacting a mixture of glutamine with ethylamine with a glutaminase under specific pH conditions.

**CONSTITUTION:** A boric acid buffer solution is added to a mixture of glutamine with ethylamine to regulate the pH to 9-12. A glutaminase obtained by culturing a microorganism (e.g. *Pseudomonas nitroreducens* IFO12694) of the genus *Pseudomonas*, extracting the resultant product from the microbial cells and purifying the extracted solution by anion exchange column chromatography is then added to the regulated mixture and reacted, as necessary, in the presence of nickel, cobalt, cadmium or zinc at 30°C for 22hr. The resultant product is subsequently purified and separated from the reaction solution by solvent partition and various chromatographies and high-performance liquid chromatography to afford the objective theanine ( $\gamma$ -glutamylethylamide).

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-55154

(24) (44) 公告日 平成 7 年(1995) 6 月14日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 13/02		2121-4B		
// C 1 2 P 13/14		2121-4B		
(C 1 2 P 13/02				
C 1 2 R 1:38)				

請求項の数 4 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平3-263120	(71) 出願人	000204181 太陽化学株式会社 三重県四日市市赤堀新町 9 番 5 号
(22) 出願日	平成 3 年(1991) 9 月14日	(72) 発明者	山田 剛 愛知県名古屋市天白区土原 3-303
(65) 公開番号	特開平5-68578	(72) 発明者	苗村 八州輝 兵庫県神戸市兵庫区大開通 8 丁目 1-25, 702号
(43) 公開日	平成 5 年(1993) 3 月23日	(72) 発明者	塩出 十一 京都府京都市右京区北嵯峨名古曾町26-8
特許法第30条第 1 項適用申請有り 「日本農芸化学会誌 第65巻第 3 号 1991年度大会(京都)講演要旨集」社団 法人日本農芸化学会(平成 3 年 3 月15日発行) 第280頁		(72) 発明者	立木 隆 京都府京都市左京区下鴨北園町107
特許法第30条第 1 項適用申請有り 社団法人 日本農芸 化学会開催による平成 3 年 4 月 1 日の日本農芸学会1991 年度大会において文章でもって発表		(74) 代理人	弁理士 細田 芳徳
		審査官	植野 浩志
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 テアニンの製造方法

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 グルタミンとエチルアミンの混合物に pH 9 ~ 12 の条件下でグルタミナーゼを作用させることを特徴とするテアニンの製造方法。

【請求項 2】 ニッケル、コバルト、カドミウムまたは亜鉛の存在下でグルタミナーゼを作用させる請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 3】 グルタミナーゼが *Pseudomonas* 属の微生物から得られる酵素である請求項 1 または 2 記載の製造方法。

【請求項 4】 請求項 3 記載の *Pseudomonas* 属の微生物が、*Pseudomonas nitroreducens*, *Pseudomonas aptata*, または *Pseudomonas denitrificans* である請求項 3 記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

2

【産業上の利用分野】

【0001】 本発明は、γ-グルタミルエチルアミド(以下、テアニンという)の新規な製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術・発明が解決しようとする課題】 テアニンは玉露の旨味の主要成分として知られ、茶をはじめとする食品の香味物質として重要な物質である。また一方、テアニンを含めてγ-グルタミル誘導体は、動・植物体における生理活性物質として作用することが指摘されている。例えば、Chem. Pharm. Bull., 19(7) 1301-1307 (1971), 同19(6), 1257-1261(1971), 同 34(7), 3053-3057 (1986), 薬学雑誌, 95(7), 892-895 (1975) には、テアニンやグルタミンがカフェインによって誘発される痙攣に拮抗することが報告されており、このことからこれらの化合物が中枢神経系に作用することが考えら

10

れ、生理活性物質としての有用性が期待されている。

【0003】従来より、テアニンの製造方法としてはテアニンを含有する玉露の生産用茶園において得られる茶葉乾燥物より抽出する方法が一般的である。しかし、この場合、テアニンは茶葉乾燥物あたりわずか1.5%前後程度しか蓄積されず、また一般の煎茶用茶園では光合成が活発であるため、ほとんど蓄積されないのが実情である。従って、茶葉乾燥物からの抽出法では工業的に実用的ではないことが指摘されている。

【0004】このようなことから、工業的生産方法の開発が期待されており、その一つとして、テアニンを化学的に有機合成する方法が報告されている(Chem. Pharm. Bull., 19(7) 1301-1307 (1971))。しかし、このような有機合成反応では収率が低く、生成物の分離精製等において煩雑な操作を必要とするという問題点が指摘されている。また、特公昭63-28596号公報では酵母が糖の醗酵の際に生成するATPを利用して、グルタミン合成酵素の存在下でグルタミン酸からテアニンを合成する方法が開示されている。しかしながら、該公報に開示されている方法は酵母の至適pHが中性(6~8)であるのに対して、グルタミン合成酵素によるテアニン合成反応の至適pHが10~11であるために両反応を組み合わせることは容易ではなく、実施が困難であることが指摘されている。

【0005】ところで、グルタミナーゼはグルタミンを加水分解してグルタミン酸とアンモニアを生成するが、ヒドロキシルアミンを加えて反応条件を選ぶことにより、 $\gamma$ -グルタミルヒドロキサム酸を生成することが知られている(S.C. Hartman, Journal of Biological Chemistry, 243巻, 853~863 ページ, 1968年)。しかし、このようなグルタミナーゼを用いてテアニンを製造する方法は知られていない。従って、本発明の目的は簡易かつ工業的に有利にテアニンを製造する方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは前記の課題を解決するために、前記のヒドロキシルアミンをエチルアミンに置き換えて種々実験を重ねた。その結果、特定の反応条件下においてグルタミナーゼを反応させることにより、意外にもテアニンを得ることができることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明の要旨は、グルタミンとエチルアミンの混合物にpH9~12の条件下でグルタミナーゼを作用させることを特徴とするテアニンの製造方法に関する。

【0007】本発明においては、pH9~12の条件下で行う必要がある。これはpHが9より小さいと図1に示すようにグルタミンの加水分解反応が大きくなるためテアニンの合成が抑えられ、pHが12より大きくなると図2に示すようにグルタミナーゼの安定性が悪くなるためテアニンの合成が進まなくなる。

【0008】本発明におけるグルタミナーゼは、その由来に特に限定されるものではなく、例えば微生物由来のものとしては、Pseudomonas属等の細菌、Saccharomyces属等の酵母、Aspergillus属等のかび等の由来の酵素が挙げられる。ここで、Pseudomonas属の微生物としては、Pseudomonas nitroreducens, Pseudomonas aptata, または Pseudomonas denitrificans等が好適な例として挙げられる。また、グルタミナーゼのその他の由来としては、植物、動物などであってもよい。

【0009】本発明におけるグルタミナーゼは、次のような物理化学的性質を有するものである。

(1) 作用

pH9~12の条件下ではグルタミンの $\gamma$ 位の転移反応を触媒し、グルタミンとエチルアミンの反応によりテアニンを合成する。pH9未満の条件下では主としてグルタミンを加水分解してグルタミン酸を生成する。

(2) 基質特異性

グルタミンを基質とする。

(3) 至適pHおよび安定pH

テアニン合成の至適pHは9~12(図1参照)、安定pHは4.5℃、10分間の熱処理ではpH11.5まで安定である(図2参照)。

(4) 至適温度および安定温度

至適温度は35~40℃、安定温度はpH11の条件下、10分間の熱処理では40℃まで安定である(図2参照)が、数時間から数十時間に及ぶ反応では反応温度を30℃とすることが好ましい。至適温度は温度条件を10、20、30、35、40、50℃に設定した場合のテアニン生成量(30℃における生成量を100とする)が、それぞれ22、52、100、147、150、12であることに基づくものである。

【0010】本発明における金属イオンによるグルタミナーゼ活性の影響は、ニッケル、コバルト、カドミウム、または亜鉛の存在下で酵素反応を行うと、グルタミナーゼによってグルタミンが加水分解されてグルタミン酸を生成する反応は抑制されるが、テアニンの合成には直接影響を与えない。即ち、加水分解活性の測定にはL- $\gamma$ -グルタミルp-ニトロアニリド(pH9)を、転移反応活性の測定にはL-グルタミン+エチルアミン(pH11)を用いてなされた試験では、表1に示されるように、ニッケル、コバルト、カドミウム、または亜鉛の存在下で酵素反応を行うと、グルタミンが加水分解されてグルタミン酸を生成するのは抑制され、テアニンの合成には直接影響を与えていない。

【0011】従って、ニッケル、コバルト、カドミウム、または亜鉛の存在下で反応させるとグルタミン酸の生成が抑制されているので、その分より効果的にテアニンを合成することができる。例えば、このニッケルを実際の反応液に添加した場合、図3に示されるようにニッケル添加によってテアニンの生成は増加し、グルタミン

酸の生成は抑制されている。

\*【表1】

【0012】

\*

表1 (金属イオンの効果)

添加量(1mM)	加水分解活性(%)	転移反応活性(%)
無添加	100	100
CaCl <sub>2</sub>	62	91
MnCl <sub>2</sub>	49	90
NiCl <sub>2</sub>	7	98
CoCl <sub>2</sub>	10	96
MgCl <sub>2</sub>	68	62
CdCl <sub>2</sub>	9	87
ZnCl <sub>2</sub>	1	88
CuSO <sub>4</sub>	23	87
SnCl <sub>2</sub>	87	100
PbCl <sub>2</sub>	41	93
BaCl <sub>2</sub>	71	84
FeCl <sub>2</sub>	16	78
AgNO <sub>3</sub>	42	109

【0013】本発明における至適グルタミン濃度は、エチルアミンを1.5Mに固定し、グルタミン濃度を0.1~0.7Mの範囲で反応させてホウ酸緩衝液(Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>・NaOH、pH11)中、30℃で1~7時間反応させて求めた(グルタミナーゼの使用量は1.0U/ml)。図4に示されるように0.7Mグルタミン、5時間で約280mM(約50g/L)のテアニンが生成しており、5時間以降では加水分解を受けて減少する傾向が見られる。この結果からすると、グルタミン濃度は0.3~0.7Mが好ましく、グルタミンからの転換率及び最大生成量を考慮すると、なかでもグルタミン濃度0.3M付近が最適である。なお、テアニン生成におけるグルタミンに対するK<sub>m</sub>値は約20mMである。

【0014】本発明における至適エチルアミン濃度は、グルタミンを0.3Mに固定し、エチルアミン濃度を2Mの範囲まで変化させた場合、1M以上の濃度でテアニンの生成量が一定となる。即ち、グルタミンを0.3Mに固定し、エチルアミン濃度を2Mの範囲まで変化させ、ホウ酸緩衝液(pH11)中、30℃で5時間反応させて求めた。図5に示されるようにエチルアミンは1M以上の濃度でテアニンの生成量が一定となる。なお、エチルアミンに対するK<sub>m</sub>値は約130mMである。

【0015】グルタミナーゼ量とインキュベーション時間との関係は、ホウ酸緩衝液(pH11)中、30℃で0.3Mグルタミン及び1.5Mエチルアミンをグルタミナーゼ0.05~0.5U/mlの範囲で23時間まで反応させた場合、図6に示されるように0.1~0.3U/mlでは直線的に増加し、時間を引き延ばすことである一定の生成量に達する。

【0016】これらの点から、本発明において効率的な

20 反応をおこなうためには、pH9~12の条件下において、グルタミン濃度は通常0.3~0.7M、エチルアミン濃度はグルタミン0.3Mに対して通常1.0M以上が好ましい。また、グルタミナーゼ量は反応時間が10時間未満の場合は通常0.8~1.0U/ml程度、10時間~30時間の場合は0.3~0.4U/mlが好ましい。また、反応時間が数時間以上の場合、反応温度は通常30~35℃が好ましい。このようにして得られるテアニンの反応液からの単離精製は、通常の公知の方法が用いられ、例えば溶媒分配および各種クロマトグラフィー、HPLCを組み合わせることにより容易に行うことができる。

【0017】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

グルタミナーゼの調製例

(a) *Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 の培養  
グルタミン酸ナトリウム0.6%、酵母エキス0.1%、グルコース1.0%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.07%、EDTA-Fe 0.01%を含む培養液(pH7)を用いて、30リットル容のジャーファメンター(30℃、通気lvvm=25リットル/min、回転数2,000rpm)中、*Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 株を約20時間培養した。

(b) 無細胞抽出液

175リットル分の菌体を洗浄後、30mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)7.5リットルに懸濁し、5~20℃で超音波破碎し、無細胞抽出液を得た。

(c) 硫酸アンモニウム分画

50

7%アンモニア水でpHを7に調整しながら硫酸アンモニウム分画を行ない、45~90%飽和画分を得た。これを0.01Mリン酸カリウム緩衝液に溶かし、同緩衝液に対して透析した。

(d) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー透析酵素液を0.01Mリン酸カリウム緩衝液で緩衝化した。次にDEAE-セルロースカラム(15×60cm)に吸着させ、グルタミナーゼを0.1Mの食塩を含む緩衝液で溶出した。

【0018】以上の操作で、実用上十分な純度のグルタミナーゼを得ることができるが、さらにCM-セルロースカラムクロマトグラフィー、セファデックスG150カラムクロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー、ブチルトヨパールカラムクロマトグラフィーを行うことにより、ディスク電気泳動的に単一の標品が得られる。精製率は250倍、回収率は10%である。

#### 【0019】実施例1

グルタミン0.3M及びエチルアミン1.5Mをホウ酸緩衝液( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , pH11)中、0.3U/mlグルタミナーゼにて30℃、22時間反応させた。反応液1リットルより225mmoleのテアニンを単離した。なお、副生成物のグルタミン酸は20mmoleであった。テアニンの反応液からの単離精製は、反応液をDowex50×8、Dowex1×2カラムクロマトグラフィーにかけ、これをエタノール処理することにより行った。

【0020】この単離物質をアミノ酸アナライザー、ペーパークロマトグラフィーにかけると、標準物質と同じ挙動を示し、塩酸あるいはグルタミナーゼで加水分解処理を行うと、1:1の割合で、グルタミン酸とエチルアミンを生じた。このように、単離物質がグルタミナーゼ\*

＊によって加水分解されたことから、エチルアミンがグルタミン酸のγ位に結合していたことが示される。また、加水分解で生じたグルタミン酸がL型であることも、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GluDH)により確認された。図7はテアニンのIRスペクトルであり、標品、単離物質ともに同一のスペクトルが得られた。これらのことから、単離物質がテアニンであることが確認された。

#### 【0021】実施例2

実施例1と同様の反応液に1mMの $\text{NiCl}_2$ を添加し、同条件で反応を行ったところ、反応液1リットルより240mmoleのテアニンを単離した。なお、副生成物のグルタミン酸は10mmoleであった。

#### 【0022】

【発明の効果】本発明によって新規なテアニンの効率的な製造方法を提供し、簡易かつ工業的有利な生産を可能とすることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1はグルタミナーゼによるテアニン合成の至適pHを示す図である。

【図2】図2はグルタミナーゼの安定pHおよび安定温度を示す図である。

【図3】図3はニッケル添加によるテアニン合成への影響を示す図である。

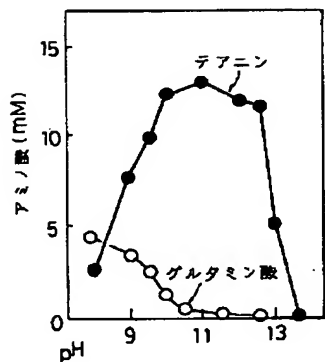
【図4】図4はグルタミン濃度によるテアニン合成への影響を示す図である。

【図5】図5はエチルアミン濃度によるテアニン合成への影響を示す図である。

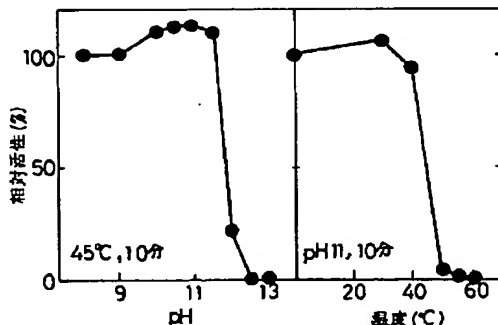
【図6】図6はグルタミナーゼ量とインキュベーション時間との関係を示した図である。

【図7】図7はテアニンの標品および単離物質についてのIRスペクトルを示した図である。

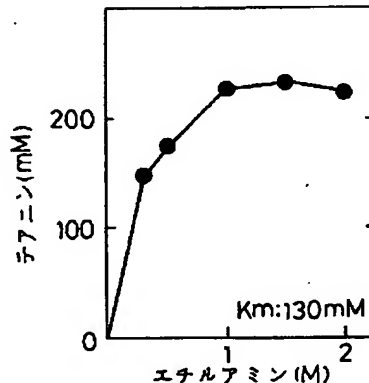
【図1】



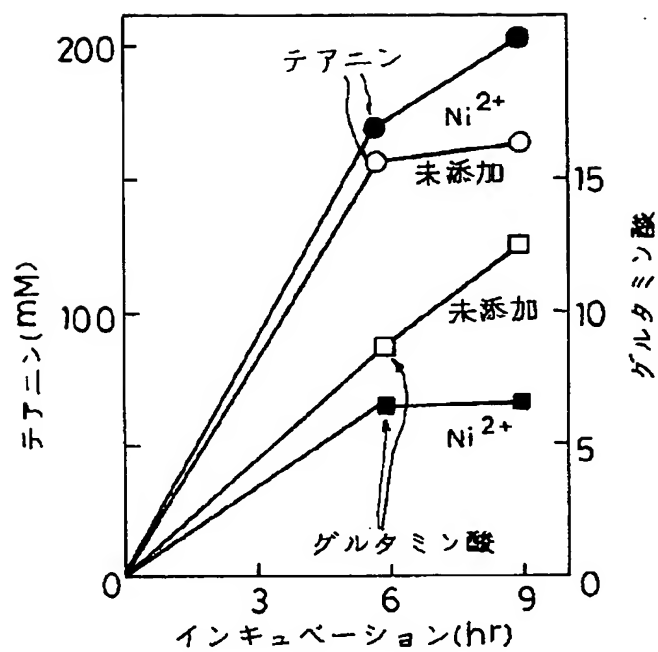
【図2】



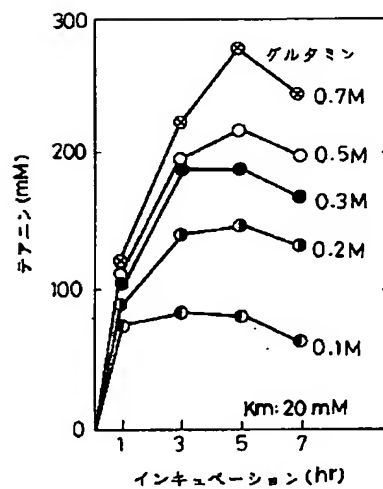
【図5】



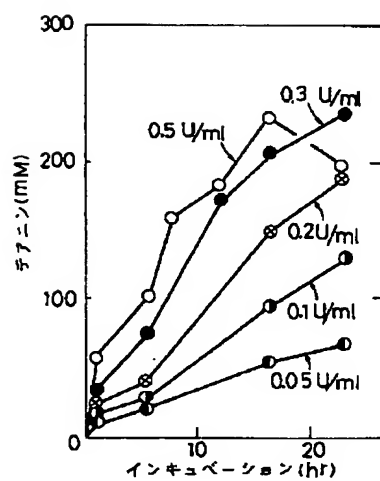
【図3】



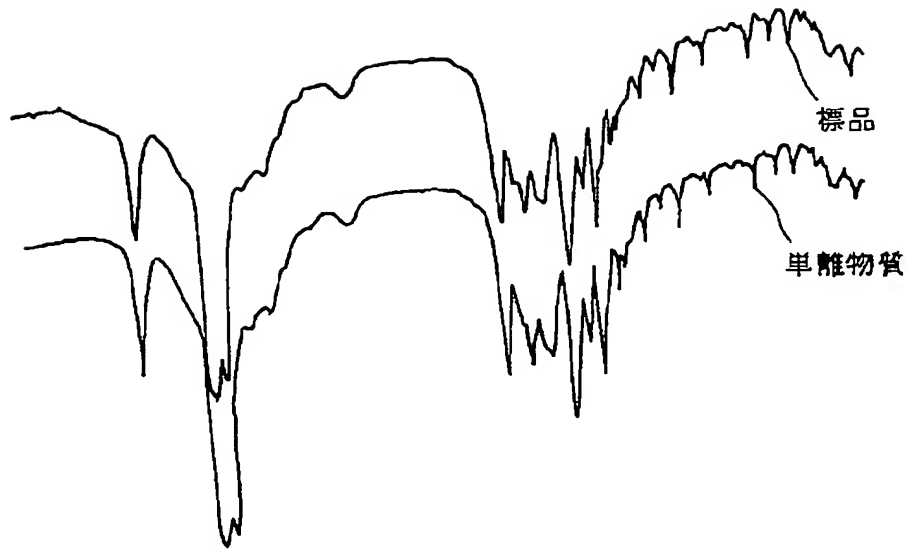
【図4】



【図6】



【図7】



---

フロントページの続き

(72)発明者 金 武祚  
三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化  
学株式会社内

(72)発明者 萩原 宣行  
三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化  
学株式会社内

(72)発明者 立石 雅也  
三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化  
学株式会社内